

UNIVERSITE MONTPELLIER II SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE MONTPELLIER

Diplôme d'études approfondies (DEA)
BIOLOGIE DE L'EVOLUTION ET ECOLOGIE

1999

Elena Diaz Almela

Structuration génétique mitochondriale chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. le long des côtes européennes, et comparaison avec la différenciation nucléaire

Stage principal effectué dans le laboratoire *Génome, Populations, Interactions*.
C.N.R.S. / Université Montpellier II, et au laboratoire *Génétique et Pathologie*.
IFREMER/U.R.M 16. Sous la direction de M François Bonhomme, M. Pierre Boudry et
Mme. Sylvie Lapègue.

Soutenu les 01, et 02 septembre 1999 devant la commission d'examen.

Membres du jury signataires du PV d'examen :

B. Delay (Président), J. Maillet (Représentant ENSA.M), J. Escarré (Directeur des études),
L. Thaler (Conseiller doctoral).

*Hay dos modos de conciencia:
una es luz, y otra paciencia.
Una estriba en alumbrar
un poquito el hondo mar;
otra, en hacer penitencia
con caña o red, y esperar
al pez, como el pescador.
Dime tu,
cual es mejor?
Conciencia de visionario
que mira en el hondo acuario
peces vivos
fugitivos,
que no se pueden pescar?,
esa maldita faena
de ir arrojando a la arena,
muertos, los peces del mar?*

Antonio Machado

SOMMAIRE

	Page:
INTRODUCTION	1
<i>Différenciation des populations en milieu marin</i>	1
<i>Les marqueurs génétiques du polymorphisme: marqueurs mitochondriaux versus microsatellites</i>	1
<i>Etat des connaissances sur la phylogéographie d'Ostrea edulis</i>	3
<i>Objetifs de l'étude : hypothèses testées</i>	3
MATERIEL ET METHODES	6
<i>Caractéristiques biologiques de l'espèce étudiée</i>	6
<i>Les échantillons</i>	6
<i>Les marqueurs</i>	8
<i>Analyse des échantillons:</i>	9
Extractions d'ADN	9
Amplification par PCR d'un fragment du gène mitochondrial de l'ARN 12S	9
Analyse du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP)	9
<i>Analyse des données:</i>	10
Analyse de la diversité haplotypique à l'intérieur des populations	10
Etude de la différenciation entre populations à partir du paramètre Fst de Wright	10

Analyse de l'isolement par la distance	12
Classification agglomérative à partir des distances de Reynolds	13
Congruence des <i>Fst</i> alléliques et haplotypiques	13
Estimation des flux géniques à l'équilibre pour les deux types de marqueurs	13
RESULTATS	15
<i>Profils sscp</i>	15
<i>Diversité haplotypique intrapopulation</i>	15
<i>structure des populations:</i>	17
Fst global, à l'intérieur des différentes mers et par paires de populations	17
Classification agglomérative des populations	18
<i>Congruence des Fst alléliques et haplotypiques</i>	20
<i>Ajustement des fréquences à un modèle d'isolement par la distance</i>	21
<i>Flux génique et équilibre</i>	23
DISCUSSION	24
<i>Diversité haplotypique à l'intérieur des populations</i>	24
<i>Comparaison des niveaux de différenciation révélés par les différents marqueurs</i>	24
<i>La position des échantillons de Mer Noire</i>	28
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	30
Références	32
Annexe 1	
Annexe 2	

INTRODUCTION

Différenciation des populations en milieu marin

Les espèces marines semblent présenter un degré de différenciation géographique plus faible que les espèces animales de milieu continental (Hedgecock, 1994 ; Ward *et al.*, 1994). Ce phénomène est classiquement expliqué par la nature ouverte des océans, par les énormes tailles populationnelles de grand nombre de ces espèces ainsi que par leurs fortes potentialités dispersives, souvent dues à une phase larvaire planctonique. Cependant, il existe quelques exemples d'espèces marines montrant des structurations spatiales à des échelles plus petites que celle de leur potentiel de dispersion. D'abord, le milieu marin n'est pas aussi ouvert que l'on pourrait croire. Des barrières invisibles comme des changements brusques de salinité ou de température dues à l'embouchure d'un fleuve ou à la présence d'un cap peuvent constituer des barrières infranchissables ; des courants contrôlent souvent les trajectoires des larves (Palumbi et Baker, 1994). En plus, certaines espèces montrent des comportements de philopatrie. Un autre mécanisme a été évoqué récemment : de fortes variances dans le succès reproducteur sont suspectées chez beaucoup d'espèces marines à forte fécondité et phase larvaire pélagique (Hedgecock, 1994), ce qui diminuerait sensiblement son effectif efficace, accélérant les processus de dérive, et augmentant donc, en dépit d'un fort flux génique, les possibilités de différenciation locale. Les études réalisées sur l'huître plate indiquent une structuration faible mais significative de ces populations naturelles coexistant avec des estimations du nombre absolu de migrants très supérieurs à 1 (Jaziri, 1990 ; Saavedra *et al.*, 1993, 1995 ; Launey, 1997)

Les marqueurs génétiques du polymorphisme: marqueurs mitochondriaux versus microsatellites

Certains phénomènes de la Biologie des Populations, tels que la structuration des populations, peuvent être étudiés de manière indirecte à l'aide de marqueurs génétiques polymorphes; ce qui permet d'intégrer l'information historique. Il existe plusieurs types de marqueurs, avec différentes propriétés, qui permettent de répondre à des questions de biologie évolutive à des échelles différentes.

Les marqueurs mitochondriaux sont des marqueurs cytoplasmiques. Ils ont été signalés comme les plus adaptés à l'étude de la structuration intraspécifique (Moritz *et al.*, 1987). En

effet, sa transmission basiquement maternelle et non recombinante, et son comportement haploïde (Boursot et Bonhomme, 1986) font que dans le cas des espèces à sexes séparés et sex-ratio de 1:1, la taille efficace de la population soit réduite théoriquement d'un facteur 4 par rapport à l'ADN nucléaire. Ceci lui conférerait une sensibilité accrue aux phénomènes de dérive, de goulots d'étranglement etc. (Moritz *et al.*, 1987). Un taux d'évolution spécialement élevé (de 1 à 10 fois plus rapide que le taux d'évolution globale pour l'ADN nucléaire (Avisé *et al.*, 1987), confère à ce marqueur un remarquable polymorphisme intraspécifique (Avisé, 1994).

Les ADN microsatellites sont des séquences répétées en tandem d'un court motif nucléotidique (1-6 paires de bases) (Queller *et al.*, 1993), et qui se trouvent dispersés dans le génome nucléaire. Ils présentent des taux de mutation entre 10^{-2} et 10^{-5} (Dallas, 1992). Les mécanismes de mutation évoqués sont principalement des glissements de la polymérase et de crossing-over inégaux (Levinson et Gutman, 1987 *in* Jarne et Lagoda, 1996), ce qui provoque d'importants polymorphismes de longueur. Plusieurs modèles de mutation, différents du modèle classique en nombre infini d'allèles (Infinite Allele Model, I.A.M.) ont été construits pour en rendre compte : par exemple le modèle pas à pas (Stepwise Mutation Model, S.M.M.), ou chaque nouvelle mutation ajoute ou élimine un motif nucléotidique.

Leur nature non-codante fait de ces séquences *a priori* de marqueurs neutres. Ces caractéristiques en plus d'une codominance complète (Queller *et al.*, 1993) font de ces séquences des marqueurs moléculaires idéaux pour l'analyse fine de la structuration des populations, permettant même la reconstruction de pedigrees.

Cependant, ce type de marqueur présente aussi quelques problèmes. En effet, les mécanismes mutationnels et le type de polymorphisme qu'ils génèrent impliquent la possibilité d'une certaine homoplasie. Estoup *et al.* (1995) montrent que l'homoplasie est fréquente entre sous-espèces d'abeille mais peut être négligée à l'intérieur de chaque sous-espèce dans ce taxon.

Les comparaisons entre marqueurs nucléaires et cytoplasmiques (en particulier microsatellites) restent encore rares, et pourtant elles peuvent être utiles. Hare et Avisé (1998), dans une étude de la structuration génétique de l'huître américaine *Crassostrea virginica*, ont démontré que différentes séquences au sein d'un même échantillon d'individus peuvent montrer des schémas phylogéographiques très différents. En effet, dans leur étude, le marqueur mitochondrial montre une discontinuité génétique entre les populations des côtes

atlantiques et celles du golfe du Mexique, qui n'est pas observée sur les trois locus nucléaires analysés. Les auteurs interprètent que le marqueur mitochondrial, dû à son temps de coalescence plus court, pourrait refléter l'existence d'une barrière fossile au flux génique, pendant la dernière glaciation. D'autres cas montrent une concordance des marqueurs cytoplasmiques et nucléaires, renforçant la structure observée. Par exemple, chez la crevette *Pennaeus monodon*, espèce des côtes de l'Australie (Benzie *et al.*, 1993), le marqueur mitochondrial confirme la division est/ouest des populations observée préalablement avec les allozymes.

Etat des connaissances sur la phylogéographie d'*Ostrea edulis*

L'huître plate *Ostrea edulis* L. est un mollusque bivalve marin, de la famille des *Ostreidae*. Contrairement à la majorité des espèces du genre *Ostrea*, dont la distribution est essentiellement pantropicale (Jaziri, 1985 *in* Jaziri 1990), *Ostrea edulis* est une espèce de mer tempérée. Sa distribution actuelle s'étend depuis la Norvège (65° degrés de latitude Nord), jusqu'à la baie d'Agadir au Maroc. Elle se trouve également sur les côtes méditerranéennes et de la Mer Noire (Ranson, 1967; Marteil, 1976 *in* Jaziri, 1990). La phylogéographie de cette espèce reste discutée. Pour certains, son origine serait atlantique (Ranson, 1948). Martinell et Marquina (1981, *in* Jaziri, 1990) sur la base de données paléontologiques, mentionnent la présence de l'espèce en Catalogne au cours du Pliocène-Quaternaire, c'est à dire, juste après la crise Messinienne. Selon Jaziri (1990), la Méditerranée aurait été un refuge pour l'espèce pendant les glaciations du Quaternaire, de sorte que les populations actuelles de la façade atlantique européenne se seraient reconstituées à partir de propagules venant de la Méditerranée.

Objectifs de l'étude : hypothèses testées

Plusieurs études ont été réalisées sur la diversité génique et la structuration géographique des populations naturelles d'huître plate. Cette espèce exploitée depuis l'Antiquité a souffert de fortes surexploitations et deux épizooties parasitaires graves pendant ce siècle, surtout sur le littoral Atlantique.

La plupart de ces travaux ont été réalisés sur la base de polymorphismes enzymatiques. Jaziri (1990) et Saavedra *et al* (1993) montrent l'existence d'une légère différenciation significative entre Méditerranée et Atlantique. De plus, Saavedra *et al.* (1995), en se basant sur des clines et des distributions en V de fréquences alléliques pour quelques locus

allozymiques, suggèrent l'existence d'un contact secondaire entre deux stocks, atlantique et méditerranéen après la dernière glaciation, au niveau de Gibraltar. Au sein de chaque mer, de très faibles différences apparaissent entre la Scandinavie et le reste de l'Atlantique (Johanesson *et al.*, 1989) et en Méditerranée entre est et ouest (Saavedra *et al.*, 1993, 1995), mais la différenciation globale semble faible, ce qui suggère l'existence d'un flux génique important.

Une étude de la structuration des populations avec cinq locus microsattellites (Launey, 1997), tout en trouvant un polymorphisme beaucoup plus important, montre des résultats de structuration géographique très congruents avec les études allozymiques antérieures; en montrant des *Fst* globaux qui ne sont pas significativement différents des *Fst* allozymiques, des structures de dendrogrammes équivalentes à celles de Jaziri (1990) et Saavedra *et al.* (1995) et les mêmes schémas de différenciation à l'intérieur de l'Atlantique et de la Méditerranée. Cependant, plutôt qu'un contact secondaire de deux stocks (Saavedra *et al.*, 1995), ce travail met en évidence une corrélation significative entre distances génétiques et distances géographiques, par paire de populations, sur l'ensemble de l'aire de répartition. Ce phénomène peut être aussi observé avec les distances génétiques enzymatiques, mesurées par le *Gst* de Nei (Julia, 1997), mais la pente de la régression devient plus raide pour les locus allozymiques. Launey (1997) avait avancé deux hypothèses possibles pour expliquer la faible pente obtenue avec les marqueurs microsattellites : les locus enzymatiques pourraient se trouver sous sélection (rappelons l'existence de clines dans les fréquences alléliques pour certains locus enzymatiques entre Méditerranée et Atlantique) ; ou bien il pourrait y avoir des phénomènes d'homoplasie aux locus microsattellites, ce qui diminuerait sensiblement la différenciation génétique apparente.

Le but de la présente étude est de comparer la structure géographique des populations d'*Ostrea edulis* révélée par un marqueur mitochondrial (un fragment d'environ 200pb appartenant à la séquence de l'ARNr 12S), avec celle obtenue avec les marqueurs nucléaires, notamment les microsattellites. En reprenant les échantillons de Launey (1997) nous nous attendons à ce que les différences observées soient uniquement dues aux propriétés intrinsèques des marqueurs et non à des différences d'échantillonnage. Les objectifs de ce travail étaient donc de savoir si le marqueur mitochondrial, dû à ses propriétés spéciales discutées auparavant (transmission par la voie femelle et sans recombinaison), montrerait une structuration différente de celle révélée par les marqueurs nucléaires, et de comparer

spécialement les flux géniques estimés par les deux types de marqueurs. En effet, si les populations d'huître plate sont à l'équilibre migration-dérive, nous nous attendons à ce que le nombre de migrants efficaces, Nm , estimé par le marqueur mitochondrial soit réduit d'un facteur 2 par rapport à celui estimé avec les marqueurs microsatellites (génome haploïde, espèce hermaphrodite).

MATERIEL ET METHODES

Caractéristiques biologiques de l'espèce étudiée

Les bancs et les cultures d'*Ostrea edulis* se trouvent dans la zone infralittorale des côtes et des étangs ouverts à la mer.

Il s'agit d'une espèce hermaphrodite, à sexualité consécutive rythmique, généralement protandrique. Le rythme de l'inversion sexuelle augmente avec la température de l'eau. Ainsi, pendant qu'en Scandinavie les huîtres plates ne changent de sexe qu'une fois par an, dans les côtes de Grande Bretagne elles peuvent changer de sexe dans une même saison reproductive. Ceci peut s'expliquer aussi par la durée de cette saison, laquelle diminue avec la latitude. La ponte de l'huître plate arrive de mars-avril à octobre sur les côtes de l'Adriatique, mais seulement entre juillet et août en Norvège. Des décalages peuvent se trouver aussi entre les zones océaniques et les parties hautes des estuaires et des bassins (Ledantec et Marteil, 1976).

En dépit de l'hermaphroditisme, il existe un déséquilibre dans le sex-ratio au cours d'une saison de reproduction chez *O. edulis*, le nombre de mâles dépassant celui des femelles. Ce déséquilibre peut atteindre un rapport de 3:1 (Ledantec et Marteil, 1976).

O. edulis est une espèce vivipare. La femelle incube les œuf dans la cavité palléale pendant 8 à 10 jours (Korringa, 1947; Marteil, 1960 in Ledantec et Marteil, 1976). Entre 500000 et un million de larves sont alors libérées, lesquelles intègrent le plancton pendant une moyenne de 10 jours, où elles se nourrissent. La durée du stade larvaire est inversement proportionnelle à la température ainsi qu'à la survie des larves. Celles qui réussissent doivent encore arriver à se fixer, et commencent alors une vie de filtreurs sessiles. D'où le fameux aphorisme espagnol "aburrirse como una ostra" (s'ennuyer comme une huître).

Les échantillons

Les échantillons de S. Launey (1997) (507 individus en total), proviennent de 13 populations naturelles d'*Ostrea edulis*, recouvrant la majeure partie de l'aire de répartition de cette espèce: l'aire nord-méditerranéenne (de la Croatie au bassin de Thau) et Atlantique (du Portugal à la Norvège). Nous avons également pu avoir accès à deux échantillons nouveaux en provenance de la Mer Noire (Sevastopol, 13 indiv, Donouzlav, 22 indiv) (Fig. 1).



Fig. 1 : Distribution géographique de l'échantillonnage. Les bordures en rouge indiquent les endroits où la présence de *O. edulis* a été reportée (D'après Jaziri, 1985 in Launey, 1997)

Par populations naturelles nous entendons soit une population n'ayant pas subi d'exploitation au cours d'un passé récent, soit une population exploitée pour l'ostréiculture à partir de captage naturel local. Les populations ayant subi des introductions externes récentes ont été exclues autant que possible, mais il faut toujours garder à l'esprit qu'il s'agit d'une espèce exploitée depuis l'Antiquité. Les échantillons ont été regroupés en fonction de leur origine géographique tels qu'ils l'ont été dans le travail de Launey (1997).

- Atlantique nord : Norvège (Oslo, 47 indiv.), Irlande du nord (Lough-Foyle, 48 indiv.), Irlande du sud (Cork 31 indiv.), Pays Bas (mer intérieure de Grevelingen, 22 indiv.) et Normandie (32 indiv.)
- Atlantique sud : Bretagne sud (Baie de Quiberon, 46 indiv.), La Rochelle (42 indiv.), Espagne (Galice, 35 indiv.), Portugal (Ria Formosa (Algarve), 14 indiv.)
- Méditerranée ouest : Etang de Thau (50 indiv.) et Port-Saint Louis du Rhône (50 indiv.)
- Méditerranée est : Italie (Venise, 23 indiv.) et Croatie (Région de Dubrovnik, 50 indiv.)

Les marqueurs

Le polymorphisme des populations d'*Ostrea edulis* a été analysé pour un marqueur moléculaire mitochondrial. Il s'agit d'un fragment d'environ 300 paires de bases du gène de l'ARN 12S.

Des amorces spécifiques pour l'amplification de ce fragment ont été définies pour *O. edulis* dans le cadre de cette étude. Pour cela, des amplifications par PCR ont été réalisées sur quelques individus provenant des extrêmes et du centre de l'aire de répartition de cette espèce. Les amorces universelles du gène mitochondrial de l'ARN 12S (Kocher *et al.*, 1989) amplifiaient faiblement deux fragments d'ADN de taille différente. Celui présentant la taille attendue (350 pb) a été prélevé après migration en gel d'agarose et réamplifié. Ce fragment a été ensuite séquencé pour un individu de Oslo et un autre de Venise. Les séquences obtenues ont été comparées avec de nombreuses séquences de l'ARN 12S déjà présentes pour d'autres organismes dans la littérature, notamment avec la séquence de l'ARN 12S de *C. gigas*, un autre mollusque bivalve, avec laquelle, la séquence obtenue présentait une forte identité (96%). Deux séquences relativement conservées entre les taxons analysés, et encerclant un segment qui présentait déjà une certaine variabilité intraspécifique ont été sélectionnées pour constituer de nouvelles amorces :

12Sbis1: 5'-GAGCAGCTGCTTAAACTCG-3'

12Sbis2: 5'-GTTAATCTCCCTTTACTCCC-3'

Les deux oligonucléotides présentent une proportion en bases GC de 10/20. A partir de 50°C de température d'hybridation, ces nouvelles amorces n'amplifient plus aucun fragment pour *C. gigas* ni pour *Pteria* spp., espèces pour lesquelles les amorces universels du 12S (Kocher *et al.*, 1989) permettent des amplifications à plus hautes températures. Par contre, les nouvelles amorces permettent encore des amplifications de l'ARNr 12S sur *O. edulis* à 56°C.

Les données brutes de polymorphisme de taille obtenues par S. Launey (non publiées) pour 5 locus microsatellites sur ces mêmes échantillons ont été reprises et traitées avec les mêmes méthodes que le marqueur mitochondrial (voir "*Analyse des données*") dans le but d'une comparaison des deux types de marqueurs.

Analyse des échantillons

Extraction de l'ADN

Des extractions d'ADN ont été réalisées selon la méthode du « phénol chloroforme » (Desmarais *et al.*, 1995), à partir de fragments de branchies conservées dans l'alcool ou congelées à -20°C. Ceci a été fait sur la totalité des nouveaux échantillons, ainsi que sur certains individus de l'échantillonnage de Launey (1997) pour lesquels les anciennes extractions aux Chelex ne permettaient plus une amplification correcte.

Amplification par PCR d'un fragment du gène mitochondrial de l'ARN 12S

La réaction de polymérisation en chaîne permet d'obtenir *in vitro* de grandes quantités d'une séquence d'ADN en se servant d'une enzyme polymérase thermorésistante. Cette technique a permis d'alléger grandement certains protocoles de biologie moléculaire, en rendant possible son utilisation dans grand nombre de problématiques de biologie des populations (Bonhomme *et al.*, 1995).

Un fragment d'environ 300 paires de bases de l'ARN 12S de l'ADN mitochondrial a été amplifié par cette méthode à partir de l'ADN total extrait, à l'aide des amorces spécifiques décrites plus haut. La composition du mélange réactionnel ainsi que le programme sont décrits en détail en annexe 1. Des témoins négatifs ont été ajoutés en routine afin de contrôler de possibles contaminations. Les produits de PCR sont colorés au bromure d'éthidium et visualisés sous U.V. après migration sous gel d'agarose à 1%. Un marqueur de taille de 100pb a permis de vérifier la taille des fragments.

Analyse du polymorphisme de conformation simple brin (S.S.C.P.)

Le polymorphisme de séquence du fragment amplifié a été mis en évidence par la méthode du polymorphisme de conformation simple brin ou S.S.C.P. (Orita *et al.*, 1989). L'ADN double brin, préalablement dénaturé, migre par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide non dénaturant. Les molécules d'ADN simple brin adoptent une conformation tertiaire dans l'espace, qui semble, pour des petits fragments, très influencée par la séquence. Pour des fragments de taille égale, la vitesse de migration dépend de cette conformation. Les conditions de migration (température, temps de migration, puissance) doivent être étroitement

ajustées et maintenues, afin de conserver une conformation spécifique et stable (Desmarais *et al.*, 1995). Cette technique permettrait de détecter environ 90% des variants lorsque ceux-ci diffèrent d'une seule mutation ponctuelle pour un fragment entre 300 et 450 pb (Hayashi, 1991, *in* Lessa *et* Applebaum, 1993). Pour un haplotype, deux bandes correspondant à chaque brin d'ADN sont attendues, mais dans certains cas, plus de deux bandes peuvent être observées, à cause de l'existence de plusieurs conformations stables pour un même brin dans les conditions choisies. Les protocoles utilisés sont décrits en annexe 1.

Analyse des données:

Analyse de la diversité haplotypique à l'intérieur des populations

La diversité haplotypique au sein des populations a été estimée par la diversité génique H de Nei (1987), qui correspond à la probabilité d'obtenir deux allèles différents lorsque nous tirons deux fois au hasard sur l'ensemble des allèles d'une population. Celle-ci correspond aussi, dans le cas des génomes diploïdes, à l'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de panmixie.

L'estimateur corrigé pour le biais d'échantillonnage (Nei, 1987) et pour des données haplotypiques $H_{n.b.} = (N/(N-1))(1 - \sum_i x_i^2)$, où N est la taille de l'échantillon et x_i la fréquence du i ème haplotype, a été utilisé à l'aide du logiciel Genetix 4.0 (Belkhir *et al.*, 1996).

L'analyse a été effectuée sur les échantillons de chaque localité. Les diversités moyennes ont été calculées à l'intérieur des regroupements par régions (Atlantique nord, Atlantique sud, Méditerranée est et Méditerranée ouest), établis par Saavedra *et al.* (1993, 1995) et par Launey (1997) (voir *Les échantillons*).

Etude de la différenciation entre populations à partir du paramètre F_{st} de Wright

Les indices F de Wright (1951) mesurent l'approche vers la fixation d'un allèle dans une population. Dans le cas des organismes diploïdes, il est évident que F mesure aussi une perte d'hétérozygotie. Dans une population subdivisée, on peut décomposer l'écart total à la fixation ($1-F_{it}$) en une composante due aux phénomènes intrapopulationnels d'écart aux conditions de Hardy-Weinberg (consanguinité, sélection...) (F_{is}); et autre due à l'écart à la panmixie due à la structuration en sous-populations (effet Wahlund) (F_{st}).

La différenciation entre populations a été estimée par l'indice F_{st} de Wright (1951), selon l'estimateur θ de Weir et Cockerham (1984), qui est un estimateur sans biais de cette valeur dans un modèle en îles infini. Nous avons choisi cet estimateur au lieu du G_{st} de Nei par ce nous ne disposons pas d'un échantillonnage homogène, et que le G_{st} est très influencé par la variation du nombre de populations échantillonnées et d'individus dans chaque échantillon (Cockerham et Weir, 1987, 1993 in Chikhi, 1995). Slatkin et Barton (1989 in Chikhi, 1995), à partir de simulations ont trouvé que lorsque les populations sont peut isolées, G_{st} avait tendance à sous-estimer les échanges migratoires et θ à les surestimer, tandis que lorsque les populations sont différenciées, les deux estimateurs donnent des résultats très proches.

Pour estimer le F_{st} , Weir et Cockerham (1984) analysent les composantes intra- et interpopulationnelles de la variance des fréquences alléliques. Plus explicitement, si nous décomposons la variance totale V en :

- A, composante de la variance des fréquences alléliques due à la différenciation en subpopulations
- B, composante de la variance des fréquences alléliques due à l'existence de différences entre les individus à l'intérieur de chaque subpopulation, et
- C, composante due aux corrélations existant entre gamètes au niveau des individus

L'estimateurs du paramètre F_{st} est lié aux composantes de la variance ($V=A+B+C$) par l'expression : $\theta = \hat{F}_{st} = A/V$

Un \hat{F}_{st} multiallélique a été calculé à l'aide du logiciel Genetix 4.0 (Belkhir, 1996), en utilisant l'estimateur θ multiallélique de Weir et Cockerham (1984) :

$$\theta = \hat{F}_{st} = \frac{\sum(A_i)}{\sum(A_i+B_i+C_i)}$$

Ou i est le i ème haplotype

Le F_{st} a été estimé pour la population globale, ainsi que pour les différents regroupements géographiques (vois *Les échantillons*). Enfin, la valeur de θ par paires de populations a été aussi calculée.

La significativité des valeurs de θ obtenues sont testées à l'aide du logiciel Genetix 4.0 (Belkhir *et al.*, 1996), qui effectue des tests non paramétriques par permutations. Pour tester l'hypothèse nulle, $\theta = 0$, on effectue des permutations aléatoires des individus sur l'ensemble des échantillons. Un nouveau θ est calculé à chaque permutation. Après un grand nombre de ces opérations (1000 dans ce cas), une distribution de la statistique θ est obtenue. Il est alors possible d'estimer la probabilité d'obtenir une valeur de θ sous l'hypothèse nulle (panmixie entre les populations) plus grande ou égale à la valeur obtenue avec la matrice de données initiale. Dans le cas des θ par paires, le seuil de significativité a été établi après une correction de Bonferroni séquentielle (Rice, 1989). Puisque nous ne connaissons pas le degré de dépendance entre paires d'échantillons, nous avons établi le seuil initial en considérant toutes les paires d'échantillons indépendantes ; donc $\alpha = 0,05/78 = 6.4 \times 10^{-4}$.

Analyse de l'isolement par la distance

L'ajustement des données haplotypiques à un modèle d'isolement par la distance a été analysé par la régression de la distance génétique par paires d'échantillons, calculée par $\theta/(1-\theta)$, et de la distance géographique par paires, mesurée par la distance côtière au curvimètre (modèle d'isolement en une dimension). Cette méthode a été définie par Rousset (1997) à partir d'un modèle de structuration des populations en pas japonais (stepping stone), mais le θ , calculé selon un modèle en nombre infini d'îles peut être utilisé pour les calculs (Rousset, 1997).

Un test de corrélation de Mantel (1967) entre la matrice des distances génétiques et la matrice des distances géographiques par paires de populations a été réalisé. Pour cela, des permutations aléatoires sont réalisées à l'intérieur d'une des demi-matrices, en simulant la situation sous l'hypothèse nulle (H_0 : distances génétiques indépendantes des distances géographiques). Le paramètre d'association z (coefficient de Mantel) entre les deux semi-matrices est calculé à partir des données réelles puis comparé à la série de pseudo-valeurs obtenues après chaque permutations. Le coefficient z de Mantel ($z = S_i S_j X_{ij} Y_{ij}$; $i = n^{\circ}$ ligne, $j = n$ colonne) permet de s'affranchir de la non indépendance des données due à sa multiplication artificielle, ce qui est notre cas lorsque nous calculons les θ par paires de populations.

Après un grand nombre de permutations (dans ce cas, 10000), une distribution du

coefficient z est obtenue. Il est alors possible d'estimer la probabilité d'obtenir une valeur de z plus grande ou égale à l'initiale sous l'hypothèse nulle.

S'il existe un isolement par la distance, dans un modèle à une dimension et pour le génome mitochondrial, nous nous attendons à obtenir une droite de pente $b = 1/2N_f\sigma^2$. Ou N_f est la taille efficace de la population de femelles, et σ^2 la variance de la position parentale par rapport à la position de la descendance (Rousset, com. pers.)

Classification agglomérative à partir des distances de Reynolds

La différenciation entre populations a été estimée par la distance génétique de Reynolds par paires d'échantillons, qui est bien adaptée pour comparer des populations faiblement différenciées (Reynolds *et al.*, 1983)

$$D = -\ln(1-Fst)$$

Où Fst par paires de populations a été estimé à partir de θ de Weir et Cockerham (1984).

A partir de la matrice des distances ainsi obtenue, nous avons construit un dendrogramme classificateur des échantillons par la méthode de neighbor-joining (Saitou *et* Nei, 1987) à l'aide du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993). Le principe de cette méthode consiste à trouver les paires de OTUs (Unités Taxonomiques Opérationnelles, dans ce cas les échantillons) qui minimisent la longueur total de branche à chaque stade d'agglomération, en commençant à partir d'un arbre en étoile. Cette méthode permet d'aboutir à un arbre non raciné de longueur minimale si les conditions d'additivité des distances observées (règle des 4 points) sont satisfaites; la longueur des branche étant proportionnelle à la distance entre les OTUs.

Congruence des Fst alléliques et haplotypiques

La congruence entre les données obtenues par les locus microsatellites et le locus mitochondrial a été analysée par une régression des valeurs de θ par paires obtenues par les deux types de marqueurs de façon globale et locus par locus. Un test de corrélation de Mantel (1967) a été également réalisé pour chaque régression, en confrontant les deux demi-matrices de θ par paires obtenues avec chaque marqueur.

Estimation des flux géniques à l'équilibre pour les deux types de marqueurs

Dans le cadre d'un modèle "en îles" où l'on considère un nombre infini de populations susceptibles d'échanger des migrants avec une probabilité uniforme et isotrope, en l'absence de sélection et de mutation et quand le système est à l'équilibre migration-dérive, F_{st} suit la relation dans le cas diploïde : $F_{st} = (1-m)^2 / (2N_e - (2N_e - 1)(1-m)^2)$, où N_e est la taille efficace de la population, et m la proportion de migrants (Wright, 1931 *in* Hartl et Clark, 1989). Dans le cas haploïde mitochondrial, il faut substituer dans cette équation $2N_e$ par $1N_f$ (Taille efficace de la population de femelles). Si on suppose cette proportion m négligeable devant 1, la suivante approximation peut être faite pour les cas diploïde et haploïde mitochondrial :

DIPLOÏDE

$$F_{st} = \frac{1}{4N_e m + 1}$$

HAPLOÏDE MITOCHONDRIAL

$$F_{st} = \frac{1}{2N_f m + 1}$$

Le nombre de migrants estimés à partir des deux types de marqueurs est comparé dans le but de voir si les différences de valeurs obtenues concordent avec les différences de taille efficace considérées théoriquement pour chaque type de marqueur, ce qui est attendu quand les populations se trouvent à l'équilibre migration-dérive.

RESULTATS

Profils sscp

Les analyses du polymorphisme de conformation simple brin du fragment de l'ARNr 12S, ont montré l'existence de 15 haplotypes différents dans la totalité de l'échantillonnage (Fig. 2). Deux sont majoritaires, et le reste sont des haplotypes rares. Les données haplotypiques détaillées pour chaque individu échantillonné sont présentées en Annexe 2.

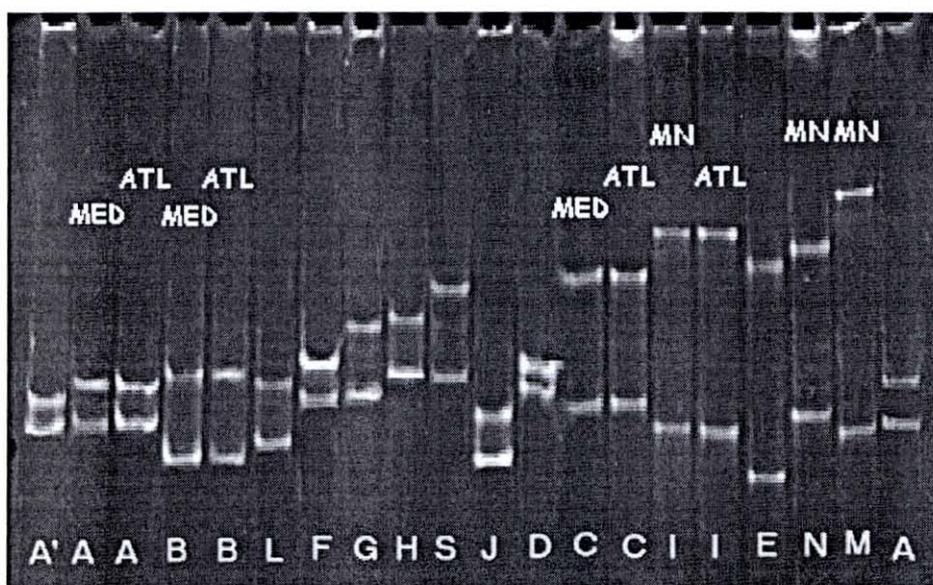


Fig. 2 : Haplotypes d'un fragment de l'ARNr 12S révélés par S.S.C.P. (MED : Méditerranée ; ATL : Atlantique ; MN :Mer Noire)

Les haplotypes majoritaires "A" et "B" présentent une inversion de fréquences entre la Méditerranée et l'Atlantique. Ils sont absents des échantillons de Mer Noire, où l'haplotype rare "I" devient dominant (Fig. 3).

Diversité haplotypique intrapopulation

La figure 4 indique les valeurs de diversité haplotypique à l'intérieur de chaque échantillon selon l'estimateur non biaisé de Nei, $H_{n,b}$. Les diversités géniques à l'intérieur de chaque "mer" ont été aussi calculées à titre indicatif.

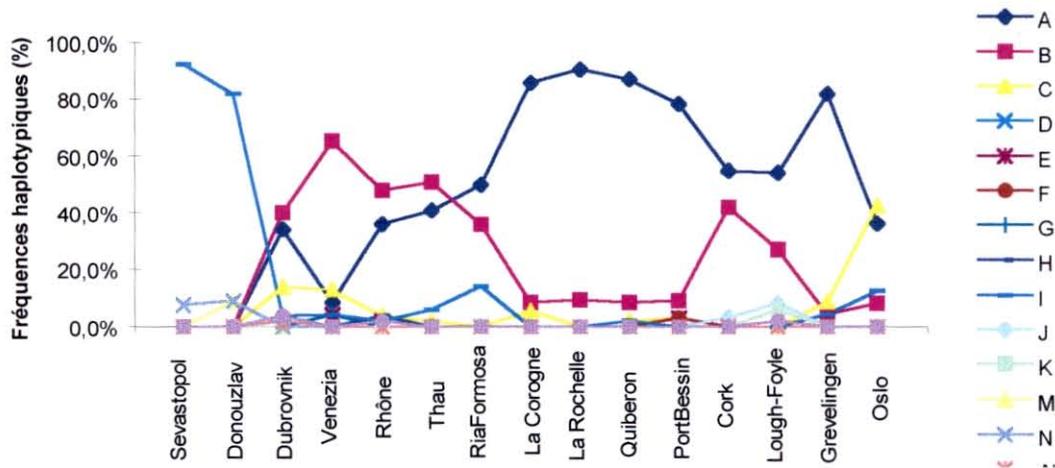


Fig. 3 : Fréquences des haplotypes dans les différents échantillons

En dépit d'un plus grand effort d'échantillonnage en Atlantique (328 indiv.) qu'en Méditerranée (173 indiv.), la diversité génétique ($H_{n.b.}$) moyenne est plus faible dans le premier regroupement ($0,434 \pm 0,170$) que dans le second ($0,629 \pm 0,054$), surtout du aux échantillons d'Atlantique "sud" ($0,332 \pm 0,158$) qu'à ceux d'Atlantique "nord" ($0,515 \pm 0,123$). Cependant, la seule différence significative, après une analyse de la variance, se trouve entre les échantillons de Méditerranée et ceux d'Atlantique sud. Nous ne trouvons pas de différence significative de diversité génétique moyenne entre Méditerranée est ($0,643 \pm 0,073$) et ouest ($0,614 \pm 0,034$).

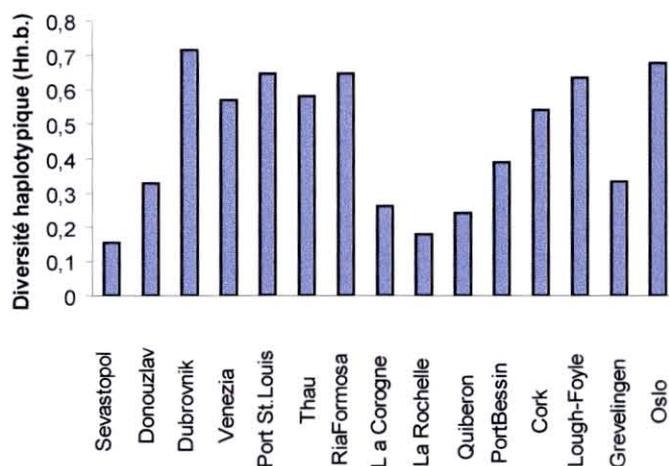


Fig. 4 : Diversité haplotypique non biaisée de Nei (1987) ($H_{n.b.}$) dans les différents échantillons

Structure des populations:

Fst global, à l'intérieur des différentes mers et par paires de populations

Dans le but d'une comparaison avec les résultats obtenus sur les locus microsatellites, nous avons estimé un *Fst* global avec et sans les échantillons de Mer Noire, et également à l'intérieur de chaque "mer". Le tableau 1 indique ces estimations selon Weir et Cockerham (1984), et leur probabilité sous l'hypothèse nulle (Tableau 1).

Tableau 1 : *Fst* globaux et au sein des différentes mers, estimés par le θ Weir et Cockerham (1984), et probabilités associées sous l'hypothèse nulle d'absence de structuration. Le seuil de significativité, après test de Bonferroni, est situé à $\alpha = 0,05/5 = 0,01$

	θ mitochondrial		θ microsatellites	
Global	0,262	$p \leq 0,001$	-	-
Global sans Mer Noire	0,179	$p \leq 0,001$	0,027	$p \leq 0,001$
Méditerranée	0,019	$p \leq 0,080$	0,017	$p \leq 0,001$
Atlantique	0,153	$p \leq 0,001$	0,02	$p \leq 0,001$
Mer Noire	0,000	$p \leq 0,776$	-	-

Le tableau 2 indique les valeurs des θ par paires d'échantillons et les probabilités associées. Le seuil de significativité est établi après correction de Bonferroni séquentielle, en considérant les paires comme complètement indépendantes entre elles, ou avec une correction de Bonferroni simple, en considérant indépendants seulement les échantillons.

Il est intéressant d'observer que les échantillons de la Méditerranée et d'Atlantique présentent tous des structurations significatives entre eux, exception faite des échantillons d'Irlande, et que l'échantillon d'Oslo se différencie significativement de tous les autres, sauf de celui de Ria Formosa (Portugal). La non-significativité de tous les *Fst* par paires incluant Ria Formosa résulte sans doute du faible effectif de cet échantillon (14 indiv.)

Nous n'avons pas inclus les échantillons de Mer Noire dans cette analyse parce que ils ne présentent aucun allèle en commun avec certains échantillons de Méditerranée et Atlantique, rendant faux les calculs de *Fst* entre eux. L'arbre construit n'ayant pour but qu'une comparaison avec celui produit avec les marqueurs microsatellites, l'inclusion de ces échantillons risquerait de distorsioner les effets produits par le seul marqueur mitochondrial.

Cependant, par sa composition haplotypique, les échantillons de mer Noire s'agglomèrent avec l'échantillon d'Oslo.

Tableau 2 : θ par paires d'échantillons, calculés à partir des fréquences haplotypiques de l'ARNr 12S, et taille des échantillons. En sombre, valeurs significatives après correction de Bonferroni séquentielle, α initial = 0,05/78 = 0,0006. En gras, valeurs significatives au seuil α = 0,05/13 = 0,004, obtenu avec correction de Bonferroni, considérant les échantillons indépendants entre eux mais pas les paires

	Grevelingen	Lough Foyle	Cork	Port Bessin	Quiberon	Roche lle	Vigo	RiaFormosa	Thau	Rhône	Venezia	Dubrovnik
Oslo (n=48)	0,203	0,159	0,120	0,222	0,309	0,348	0,271	0,136	0,205	0,180	0,261	0,107
Grevelingen		0,095	0,172	0,000	0,016	0,010	0,000	0,152	0,261	0,250	0,489	0,211
LoughFoyle			0,000	0,066	0,133	0,156	0,116	0,000	0,052	0,048	0,220	0,04
Cork				0,128	0,214	0,245	0,193	0,000	0,003	0,011	0,184	0,025
Port Bessin					0,000	0,008	0,000	0,118	0,225	0,216	0,455	0,188
Quiberon						0,000	0,000	0,226	0,311	0,305	0,570	0,277
La Rochelle							0,000	0,280	0,339	0,332	0,610	0,306
Vigo								0,203	0,289	0,281	0,540	0,248
RiaFormosa									0,000	0,000	0,155	0,001
Thau										0,000	0,082	0,007
Rhône											0,059	0,000
Venezia												0,063
Taille de l'échantillon	27	48	32	34	46	44	35	14	50	50	23	50

Classification agglomérative des populations

Les arbres non racinés obtenus avec les marqueurs mitochondrial et microsatellites, par la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) sur les distances de Reynolds, sont présentés dans la figure 5. Il existe des différences de taille et de structure entre les deux arbres. Les distances de Reynolds entre échantillons pour l'ARN 12S sont environ 10 fois plus fortes que celles relevées pour l'ensemble des locus microsatellites.

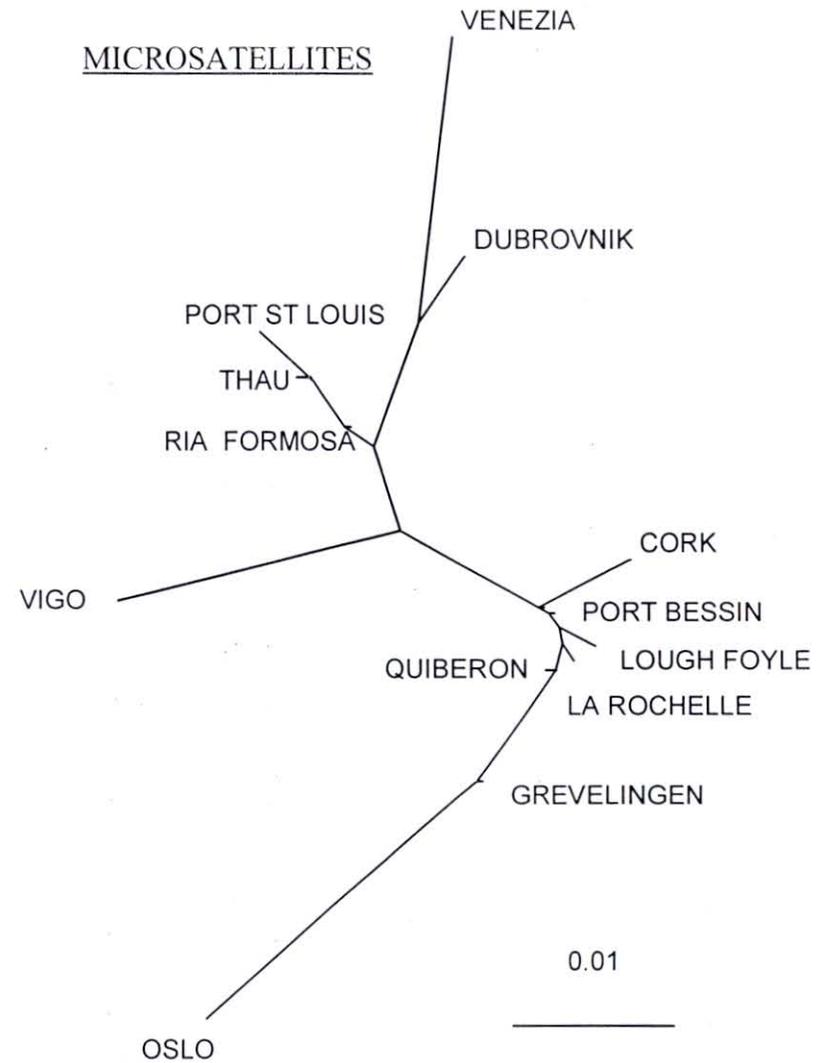
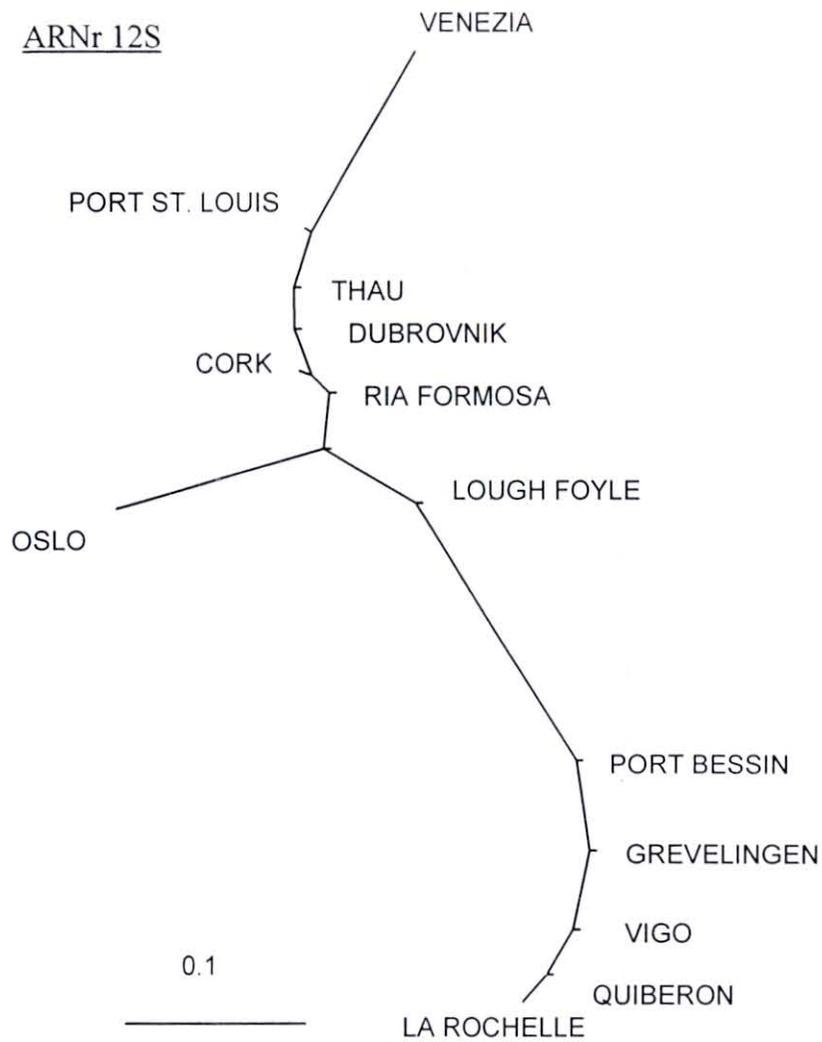


Fig 5 : Arbres non enracinés des échantillons, inférés à partir des matrices de distances génétiques de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983) sur le marqueur ARNr 12S, et sur l'ensemble des marqueurs microsatellites (Launey, 1997). Les deux arbres sont construits par la méthode de Neighbor-joining (Saitou et Nei, 1987)

Congruence des *Fst* alléliques et haplotypiques

Le tableau 3 indique les valeurs de corrélation et leur probabilité sous l'hypothèse nulle d'indépendance, entre les valeurs de θ obtenus avec le locus mitochondrial par paires d'échantillons, et ceux obtenus avec les locus microsatellites, rassemblés ou bien un par un.

Les coefficients de corrélation sont faibles pour les locus microsatellites pris un par un. Après correction de Bonferroni séquentielle (seuil initial $\alpha = 0,05/6 = 0,008$; deuxième seuil $\alpha = 0,05/4 = 0,013$), seulement la corrélation avec l'ensemble des locus microsatellites, et celle avec le locus H15 sont significatives. Ceux avec U2 et T5 frôlant la significativité.

Tableau 3 : Coefficients de corrélations z de Mantel (et probabilité associée) et r de Pearson, des θ par paires mitochondrial et microsatellites (regroupés ou locus par locus) (seuil de significativité avec correction de Bonferroni séquentielle α initial = $0,05/6 = 0,008$)

Corrélation entre les θ de	z (Coef. de Mantel)	r (Coef. de Pearson)
ARNr12S/ θ microsatellites	0,868 $p \leq 0,005$	0,59
ARNr12S/ θ J12	1,723 $p \leq 0,123$	0,34
ARNr12S/ θ U2	0,331 $p \leq 0,016$	0,50
ARNr12S/ θ H15	0,212 $p \leq 0,002$	0,55
ARNr12S/ θ O9	0,564 $p \leq 0,146$	0,29
ARNr12S/ θ T5	0,492 $p \leq 0,015$	0,48

La droite de régression des θ par paires mitochondriaux et microsatellites présente une pente de 0,07 (Fig.6). Cette même pente est de 0,13 avec le seul locus H15.

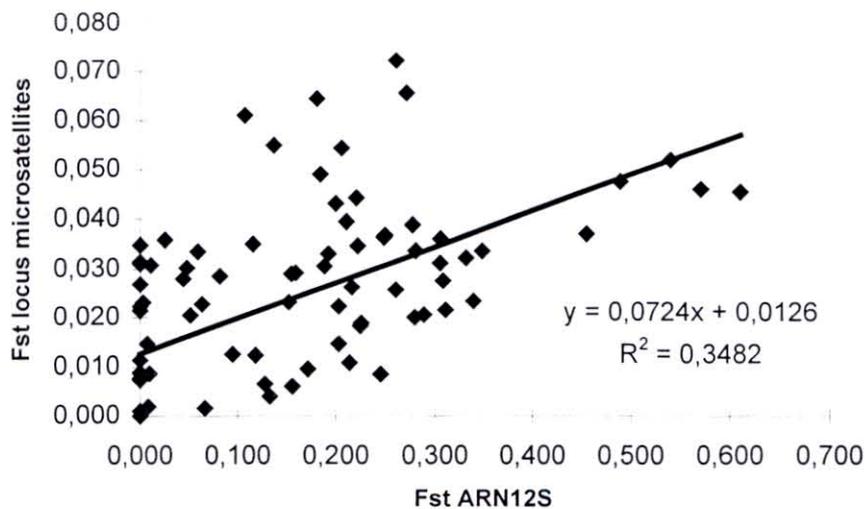


Fig. 6 : Droite de régression, obtenue par la méthode des minimums carrés, des θ par paires obtenus avec l'ARNr 12S et les θ par paires obtenus avec l'ensemble des locus microsatellites. Equation de la droite obtenue et coefficient de corrélation r^2 de Pearson

Ajustement des fréquences à un modèle d'isolement par la distance

La figure 7 .montre la régression de la distance génétique par paires d'échantillons, estimée par $\theta/(1-\theta)$ sur la distance géographique (Rousset, 1997). Le paramètre d'association z est significatif pour la régression globale ($p \leq 0,01$), mais pas au sein de chaque mer ($p \leq 0,1$ en Atlantique et $p \leq 0,7$ en Méditerranée).

La pente de la droite de régression est de $b = 3 \times 10^{-5} \text{ Km}^{-1} = 1/2N_e\sigma^2$, où σ^2 est la variance de la position parentale par rapport à la descendance (Rousset, 1997). Nous pourrions donc déduire, si la taille efficace de la population de femelles était connue, la distance moyenne parcourue par les larves avant fixation au substrat, dans un modèle en pas japonais (par $\sigma = (1/2N_e b)^{1/2}$; dans le cas diploïde nucléaire $\sigma = (1/4N_e b)^{1/2}$, où N_e est la taille efficace de la population). En reprenant les estimations moyennes de taille efficace de l'espèce *Ostrea edulis*, obtenues par Launey (1997), à partir des données microsatellites, sous les modèles de mutation pas à pas (S.M.M) ou en nombre infini d'allèles (I.A.M), nous avons réalisé différentes estimations de σ (Tableau 4).

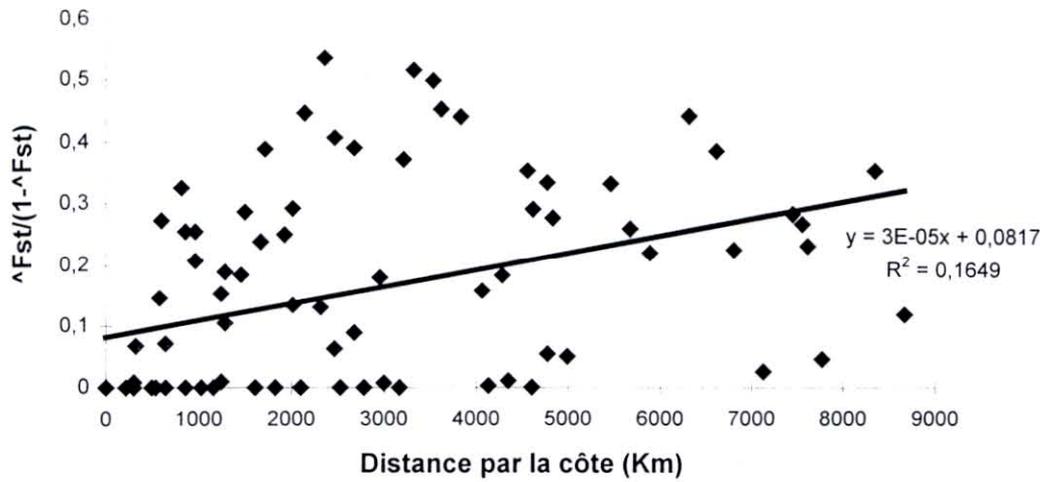


Fig. 7 : Droite de régression de la distance génétique ($\theta/(1-\theta)$) par rapport à la distance géographique côtière (Km) (Rousset, 1997). Equation de la droite et coefficient de corrélation r^2 de Pearson. Les droites obtenues par les mêmes régressions avec les marqueurs microsatellites et enzymatiques sont également signalées à titre comparatif

Il est intéressant de remarquer que toutes les estimations de σ convergent vers une valeur de l'ordre du Kilomètre, aussi différentes les tailles efficaces soient elles.

Tableau 4 : Estimations de σ (km) (σ^2 , variance de la position parentale par rapport à sa descendance) estimé selon Rousset (1997) sous l'hypothèse d'un isolement par la distance, et utilisant les tailles efficaces moyennes estimées pour les populations naturelles d'*Ostrea edulis*, sous un modèle de mutation en nombre infini d'allèles (I.A.M), et un modèle pas à pas (S.M.M) des locus microsatellites (Launey, 1997)

	Ne I.A.M. (Launey, 1997)		Ne S.M.M. (Launey, 1997)	
MITOCHONDRIAL	$N_f = N_e = 24500$	$\sigma = 0,83$ km	$N_f = N_e = 161500$	$\sigma = 0,32$ Km
	$N_f = (1/2)N_e = 12250$	$\sigma = 1,17$ "	$N_f = (1/2)N_e = 80750$	$\sigma = 0,45$ "
	$N_f = (1/4)N_e = 6125$	$\sigma = 1,65$ "	$N_f = (1/4)N_e = 40375$	$\sigma = 0,64$ "
MICROSATELLITES	$N_e = 24500$	$\sigma = 1,6$ "	$N_e = 161500$	$\sigma = 0,62$ "
ALLOZYMES	$N_e = 24500$	$\sigma = 1,01$ "	$N_e = 161500$	$\sigma = 0,39$ "

Flux génique et équilibre

Le nombre de migrants estimés sous un modèle en îles, et sous les hypothèses d'équilibre migration/dérive, et de neutralité, à partir de la valeur de θ globale microsatellite est $N_{em} = 9$. Le nombre de migrants femelles estimé à partir de la valeur de θ mitochondriale globale est $N_{fm} = 2,3$. la relation $\alpha = N_{fm}/N_{em} = 0,255 \approx 1/4$; c'est à dire, quatre fois plus petite que le rapport attendu $\alpha = 1$, par le biais des formules tenant compte du niveau de ploïdie. En admettant que la proportion de migrants reste égale (ce qui est plausible, puisque la migration de cette espèce se fait pendant le stade larvaire, et que les individus sont hermaphrodites), cette relation serait assimilable à une différence entre la taille efficace globale et la taille efficace des femelles.

Discussion

Diversité haplotypique à l'intérieur des populations

La diversité génétique intrapopulation révélée avec l'ARNr 12S est plus faible que celle révélée par les locus microsatellites avec les mêmes échantillons. La diversité génique de Nei ($H_{n.b.}$) moyenne aux locus microsatellites était de 0,907 ; presque le double que pour le seul locus mitochondrial (0,494). Cependant, le marqueur mitochondrial révèle une plus forte hétérogénéité dans les valeurs de $H_{n.b.}$ entre les échantillons (variance $\sigma^2 = 0,0269$ par rapport à $\sigma^2 = 0,0016$ pour la moyenne des microsatellites). Ce résultat et l'absence de corrélations entre les diversités révélées par l'un et l'autre marqueur sont cohérents avec l'idée que les phénomènes de dérive occasionnés par exemple par des accidents démographiques, agissent plus intensément sur le génome mitochondrial à cause de son niveau de ploïdie, de sa taille efficace plus faible, et d'un taux de mutation relativement plus faible que sur l'ADN microsatellite. Cette instabilité pourrait d'ailleurs expliquer aussi les faibles corrélations observées entre les *Fst* par paires estimés par les deux marqueurs.

Chez *O. edulis* nous retrouvons donc les plus faibles diversités géniques, déjà reportées dans la littérature, mais d'une façon plus marquée : ainsi, dans ce travail des valeurs de $H_{n.b.} = 0,434$ en Atlantique et de $H_{n.b.} = 0,629$ en Méditerranée sont reportés, tandis que Launey (1997) trouve de $H_{n.b.} = 0,904$ en Atlantique, et de $H_{n.b.} = 0,913$ en Méditerranée ; et Jaziri, (1990) et Saavedra *et al.* (1995), obtiennent des hétérozygoties attendues $H_e = 0,101$ à $0,113$ en Atlantique, par rapport à $H_e = 0,120$ à $0,174$ en Méditerranée. Selon Jaziri (1990), la diminution de la diversité génique en Atlantique pourrait refléter une recolonisation de ces côtes à partir des stocks méditerranéens, après la dernière glaciation du quaternaire. Cependant, il est intéressant de remarquer que dans les échantillons d'Irlande et d'Oslo, nous retrouvons des valeurs de diversité haplotypique, semblables à celles de Méditerranée.

Comparaison des niveaux de différenciation révélés par les différents marqueurs

Relativement peu d'études portent à la fois sur des marqueurs mitochondriaux et microsatellites. Certains présentent des résultats très congruents entre les deux (Tessier *et al.* 1997 ; Simonsen *et al.*, 1998). D'autres donnent des différences quantitatives (valeurs de *Fst*),

mais pas qualitatives ("forme" des arbres). Par exemple, Bérubé *et al.* (1998), étudiant des populations de baleines, montre des F_{st} mitochondriaux 1,4 fois plus forts (F_{st} moyen = 0,25) que ceux obtenus avec les marqueurs microsatellites (F_{st} moyen = 0,175). Ces différences sont expliquées par des différences de comportement dispersif entre mâles et femelles. Hansen *et al.* (1999), observe chez le corégone des F_{st} mitochondriaux 3 fois supérieurs aux F_{st} calculés avec des marqueurs microsatellites, et les résultats ne sont pas qualitativement congruents. C'est également le cas en ce qui concerne notre étude.

L'arbre obtenu à partir de nos données mitochondriales présente certaines différences avec les arbres obtenus antérieurement avec les marqueurs microsatellites (Launey, 1997) et allozymiques (Saavedra *et al.*, 1995), montrant notamment moins de cohérence avec la distribution géographique des échantillons. En effet, les échantillons d'Irlande se rapprochent de la Méditerranée, probablement par suite de l'augmentation de la fréquence de l'haplotype "B". L'échantillon d'Oslo se sépare fortement du reste de l'Atlantique. Ceci est probablement dû à la forte fréquence relative des haplotypes rares "C" et "I". Une faible différenciation des populations de la Scandinavie par rapport au reste de l'Atlantique a été reportée par certains auteurs (Johanesson *et al.*, 1989 ; Launey, 1997).

Cependant, les distances génétiques ($\theta / 1 - \theta$) calculés avec le marqueur mitochondrial montrent une bonne corrélation avec la distance géographique à niveau global ; tout comme les distances génétiques estimées avec les marqueurs microsatellites et allozymiques. Bien que la pente de cette régression soit 10 fois plus forte avec l'ARNr 12S que avec l'ensemble des marqueurs microsatellites ($b = 4 \times 10^{-6}$; Launey, 1997) ; et trois fois plus grande que celle obtenue sur les fréquences allozymiques ($b = 1 \times 10^{-5}$ Julia, 1997). Cet ajustement des données à un modèle d'isolement par la distance n'appuierai pas les thèses de Saavedra *et al.* (1995) d'une discontinuité entre deux stocks au niveau de Gibraltar.

Les différences d'ordre quantitatif s'expriment aussi à niveau de la structuration révélée sur l'ensemble de l'aire d'échantillonnage. En effet, le \hat{F}_{st} global mitochondrial est presque sept fois plus grand ($\theta = 0,179$) que celui obtenu avec l'ensemble des marqueurs microsatellites ($\theta = 0,027$), et plus de trois fois plus grand que le F_{st} moyen estimé sur les locus allozymiques (0,058) (Saavedra *et al.*, 1993, 1995).

Parmi toutes les forces non exclusives qui peuvent causer ces fortes différences dans les *Fst* moyens et par paires, mitochondriaux et nucléaires, on peut citer a priori:

1- une forte homoplasie sur les microsatellites : Des allèles identiques par état mais pas par ascendance, s'ils sont présents dans des populations géographiquement distinctes, peuvent diminuer le *Fst* apparent et donc surestimer le flux génique lié à lui (Jarne et Lagoda, 1996). Cependant, Rousset (1996) montre que l'effet d'une éventuelle homoplasie des microsatellites sur le *Fst* et le Nm n'est pas simple, et dépend du modèle de mutation. Un modèle de mutation pas à pas (S.M.M.), ou chaque nouvelle mutation ajoute ou élimine un motif nucléotidique, ou un modèle en nombre fini d'allèles possibles (K.A.M.), impliquent l'existence d'une certaine homoplasie. Mais est ce que celle-ci aurait un effet sur le *Fst*? Il est admis qu'une mutation en nombre finis d'allèles n'aurait pas d'effet direct sur le *Fst* mais sur sa variance (Jarne et Lagoda, 1996), mais quel est le cas pour un modèle en S.M.M.? Rousset (1996) établie des prédictions théoriques de *Fst* pour un modèle I.A.M. et un modèle K.A.M. de mutation, mais pas dans un modèle S.M.M. Le modèle S.M.M. produirait une distribution normale des fréquences des allèles ordonnés par tailles. Cependant, Launey (1997) n'observe clairement cette distribution que pour le locus O9, précisément un des locus pour les quels la corrélation des *Fst* par paires avec les *Fst* par paires mitochondriaux n'est pas significative ($p \leq 0,146$). De plus, nous retrouvons la corrélation plus significative ($p \leq 0,002$) précisément avec le locus H15, celui qui présente une distribution plus clairement multimodale. Nous avons par ailleurs considéré que le taux de mutation était négligeable devant celui de migration, mais en utilisant la formule qui relie flux génique et *Fst* dans un modèle en îles, et les estimations les plus pessimistes de taille efficace de Launey (1997) (15000) ($m = 1 - Fst / 4NeFst$), nous obtenons des taux de migration de l'ordre de 10^{-4} , ce qui correspond à un taux de mutation moyen pour les microsatellites. Ceci pourrait aussi expliquer les faibles corrélations observées avec les *Fst* et les Hn.b. mitochondriaux.

2- Un taux de migration plus faible par la voie femelle. Ceci provoquerait une homogénéisation moins forte chez le locus à transmission maternelle qu'avec un locus nucléaire. C'est le cas chez les baleines (Palumbi et Baker, 1994 ; Bérubé *et al.*, 1998). Dans le cas de l'huître plate, cette hypothèse nous semble peu vraisemblable, puisqu'il s'agit d'une espèce hermaphrodite, et que sa phase dispersive se fait pendant la phase larvaire pélagique.

3- une différence de taille efficace entre génome nucléaire et cytoplasmique : due à la transmission par voie femelle du génome mitochondrial. Birky *et al.* (1988) ont montré par des simulations, qu'il faudrait des sexe ratio très déséquilibrés (plus d'un mâle pour 15 femelles) pour obtenir des structurations supérieures avec le génome nucléaire que avec le cytoplasmique. Nous avons considéré a priori que cette espèce, par sa sexualité hermaphrodite consécutive et rythmique, ne présenterait pas de grandes différences entre l'effectif reproducteur femelle et l'effectif reproducteur total, puisque tous les individus auraient une chance de devenir femelles et donc de transmettre leur génome mitochondrial. Donc, des différences de *Fst* de l'ordre de 3, comme celle observée entre locus mitochondrial et allozymiques, pourraient être expliquées par la différence du niveau de ploïdie (2); mais pas les différences d'ordre 10 que nous trouvons avec les microsatellites.

Si ont réussi à s'affranchir d'autres possibles sources de différences on devrait s'attendre à trouver les mêmes estimations de flux génique avec les deux marqueurs (voire matériel et méthodes). Cependant; l'estimation de Nm obtenue par les marqueurs microsatellites est quatre fois plus grande que celle obtenue par le marqueur mitochondrial. Cette différence pourrait être due à ce qu'un des marqueurs ou bien les deux ne se trouvent pas à l'équilibre mutation/dérive, ce qui ne permettrait pas d'établir la classique relation entre le *Fst* et le nombre de migrants.

Cependant, certains aspects de la sexualité d'*Ostrea edulis* pourraient nous donner d'autres pistes sur l'origine de cette différence. En effet, les cohortes de cette espèce présentent des sex-ratio déséquilibrés, qui peuvent atteindre une relation de 3 mâles par femelle au cours d'une saison de reproduction (Ledantec et Marteil, 1976), ce qui coïncide avec le ratio du nombre de migrants : 1/4. Cependant, un déséquilibre de sex-ratio ne pourrait influencer la taille efficace des femelles que si la probabilité d'en devenir une n'est pas homogène pour tous les individus. Ce déséquilibre et la lenteur relative pour développer des gonades femelles, au cours d'une saison de reproduction (Ledantec et Marteil, 1976) reflètent probablement un plus grand coût pour la fabrication d'ovocytes. D'ailleurs, cette espèce est généralement protandrique La probabilité de devenir femelle pourrait donc ne pas être homogène pour tous les individus. Elle pourrait être liée par exemple à des facteurs comme la vitesse de croissance. Les récentes épizooties souffertes par l'huître plate pourraient aussi jouer sur cette probabilité, étant donné qu'elle causent de fortes mortalités surtout entre les adultes âgés de

moins de 2 ans, ceci pourrait diminuer le nombre d'individus qui parviennent à devenir femelles.

Il serait aussi possible que la variance du succès reproducteur des femelles soit plus grande que celle des mâles, ce qui pourrait alors amplifier l'effet sur la différence de tailles efficaces. Le succès reproducteur de beaucoup d'espèces marines dépend souvent de la capacité où de la chance d'émettre les larves au bon moment hydrographique (Hedgecock, 1994). Puisque *Ostrea edulis* est une espèce vivipare, le succès reproducteur des femelles pourrait être plus affecté par ce phénomène que les mâles, si ceux-ci réussissent à féconder plusieurs femelles.

Par ailleurs, il faudrait intégrer toutes ces informations dans un modèle à générations chevauchantes prenant en compte la mortalité et la durée relative de chaque phase pour avoir des prédictions plus réalistes.

La position des échantillons de Mer Noire

Les échantillons de Mer Noire présentent une composition haplotypique très différente du reste de l'échantillonnage. L'haplotype "I", normalement rare, devient ici dominant. Cette différence et la faible diversité haplotypique, refléteraient-ils un effet de fondation dans la colonisation de la Mer Noire, suivi d'une stabilisation.?. Actuellement le flux des eaux se fait fondamentalement de la Mer Noire vers la Méditerranée, rendant difficile la colonisation de la première par les espèces à dispersion passive méditerranéennes (Moraitou-Apostolopoulo, 1985), ce qui est le cas de l'huître plate. A la fin du Pliocène, une pénétration des eaux méditerranéennes dans l'ancien Parathéthys aurait introduit une bonne partie de la faune méditerranéenne se trouvant actuellement en Mer Noire (Ekman, 1968). La colonisation de la Mer Noire par l'huître plate pourrait bien dater de cette époque. L'effectif efficace de ces populations est probablement réduit, puisqu'il s'agit d'une "petite mer" ; l'effet de la dérive peut donc être fort, et pourrait donc maintenir de faibles diversités dans les populations pendant longtemps.

De plus, les populations d'huîtres plates de Mer Noire n'ont probablement pas maintenu des tailles constantes entre-temps. Les glaciations du quaternaire ont coupé d'une façon intermittente la connexion de la Mer Noire avec la Méditerranée, et la première aurait eu des diminutions de température plus importantes (Por, 1978). Il serait vraisemblable que des populations d'huîtres plates dans la Mer Noire auraient vu leur densité se réduire

dramatiquement pendant les pics de Glaciation, puisque chez cette espèce la ponte devient rare en dessous de 14°C, et la gamétogénèse n'a pas lieu en dessous de 10°C (Ledantec et Marteil, 1976).

Magoulas *et al.* (1996) observent aussi de fortes différenciations entre les stocks d'anchois (*Engraulis encrasicolus*) de la mer Noire et de la mer Egée, ainsi qu'une diversité génique beaucoup plus faible chez les premiers, et émettent des hypothèses semblables pour l'expliquer.

Un autre explication de la faible diversité génique de *O. edulis* en Mer Noire serait l'existence de goulots d'étranglements contemporains. En effet, les conditions environnementales de cette mer presque intérieure n'ont cessé de se dégrader au cours des dernières décennies, Une forte eutrophisation des eaux côtières a changé fortement la composition du plancton, et provoque de fortes crises d'anoxie, surtout dans la partie occidentale (Kholodov, 1994). Les Gisements d'huître plate en Ukraine étaient reportés comme très abondants avant la révolution de 1917 ; mais maintenant cette espèce est très rare (Matbaasi, 1996). La disparition de cette espèce en Géorgie a été liée à l'introduction en 1946 du gastéropode *Rabana thomasia* (Matbaasi, 1996).

Les échantillons de Mer Noire n'ont pas été inclus dans l'arbre. Ils sembleraient pourtant avoir une ressemblance avec ceux de l'échantillon d'Oslo, surtout à cause d'une plus grande fréquence de l'haplotype rare "I". Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces phénomènes:

Il est possible que deux séquences différentes partagent une même conformation simple brin, empêchant de les distinguer par une analyse SSCP. Pour un fragment de entre 400 et 300 paires de bases, la probabilité de ne pas détecter cette différence doit être entre le 10% attendu pour un fragment de entre 300 et 400 pb, et le 1% pour un fragment de entre 200 et 300 pb (Hayashi, 1991, *in* Lessa *et* Applebaum, 1993). Les haplotypes "I" relevés en Mer Noire sont-ils différents de ceux trouvés en Méditerranée et en Atlantique?. Seul le séquençage permettra de répondre à cette question

Par contre, s'il existe bien une identité dans les haplotypes I, elle pourrait refléter une introduction anthropique d'huîtres provenant de la Mer Noire dans la mer Baltique. Pendant l'époque des Tzars de Russie, il a eu un commerce florissant d'huîtres plates de Mer Noire vers toutes les villes de l'empire, dont St. Petersburg, (Berthe, F. comm. pers.). Cependant, la possibilité d'un transfert accidentel ou volontaire d'huîtres dans un sens ou l'autre reste hypothétique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ostrea edulis est une espèce à fort potentiel de dispersion (phase larvaire pélagique de 8 à 10 jours). Toutefois, notre analyse a révélé une structuration significative entre populations, sur l'ensemble de l'échantillonnage (0,179, $p \leq 0,001$) et au sein de l'Atlantique (0,153, $p \leq 0,001$), mais pas au sein de la Méditerranée (0,019, $p \leq 0,080$), ainsi que des fortes différences de diversité génique (Hn.b.) entre les différents échantillons. Les données de polymorphisme obtenues avec cinq marqueurs microsatellites sur le même échantillonnage, montrent des valeurs de F_{st} entre sept et 10 fois plus faibles, et beaucoup moins de différences de diversité génique entre les populations. Des incongruences sont aussi retrouvées au niveau de la "forme" des arbres des populations construits à partir du fragment de l'ARN 12S. En effet, les populations d'Irlande et d'Oslo se séparent du reste de l'Atlantique, du à sa composition haplotypique, mais aussi probablement à ses plus fortes diversités par rapport au reste de l'Atlantique. Quoi qu'il en soit, les deux marqueurs indiquent une bonne corrélation de la distance génétique avec la distance géographique, même si les pentes obtenues sont très différentes. Les estimations de l'écart type de la position parentale par rapport à sa descendance (σ) ne dépassent pas l'ordre du Kilomètre (0,4 à 1,7), ce qui est surprenant pour une espèce avec une phase larvaire de 10 jours.

Les différences quantitatives observées semblent plus fortes que celles reportées dans la littérature dues à l'haploïdie de l'ADN mitochondrial, ainsi qu'à sa transmission par voie femelle. Un séquençage nous permettrait d'établir le degré de divergence entre les différents haplotypes. Si la dérive a agit fortement au sein de certaines populations, cela devrait se refléter dans une incongruence de la phylogénie des haplotypes avec la géographie.

Nous observons des différences d'un facteur 4 entre la taille efficace totale et celle des femelles. La probabilité de devenir femelle n'est probablement pas homogène chez cette espèce hermaphrodite, et/ou la variance du succès reproducteur des femelles peut être plus grande.

Nous avons mis en évidence une faible corrélation entre les F_{st} par paires estimés avec le marqueur mitochondrial et avec chacun des locus microsatellites ; puis une absence totale de corrélation entre les diversité alléliques et haplotypiques. Les diversités géniques des locus microsatellites (0,9) doublent pratiquement celles de l'ARNr 12S (0,5). Nous pourrions donc

expliquer l'absence de corrélation par un plus fort taux de mutation chez les microsatellites qui régénérerait plus vite de la diversité après une crise démographique, combinée à la plus grande sensibilité de l'ADN mitochondrial aux phénomènes de dérive. Il serait intéressant d'analyser les modèles et les taux de mutation des locus microsatellites pour voir s'ils peuvent rendre compte des différences de structuration observées, ainsi que des faibles corrélations.

Finalement, la composition haplotypique insolite des échantillons de Mer Noire, et sa diversité haplotypique extrêmement faible suggèrent l'existence d'un flux génique très limité avec les populations méditerranéennes, et probablement aussi l'existence passée ou contemporaine de crises démographiques.

Références

- AVISE J.C., ARNOLD J., MARTIN BALL R., BERMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J.E., REEB C.A., SAUNDERS N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst* **18**: 489-522.
- AVISE J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York
- BELKHIR K., BORSA P., GOUDET J., CHIKHI L., BONHOMME F. (1996). Genetix, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, Université de Montpellier II.
- BENZIE J.A.H., BALLMENT E., FRUSHER S. (1993). Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. *Aquaculture* **111**: 89-93.
- BERUBE M., AGUILAR A., DENDANTO D., LARSEN F., NOTARBARTOLO DI SCIARA G., SERRS R., SIGURJONSSON J., URBAN R., PALSOLL P.J. (1998). Population genetic structure of north atlantic, mediterranean sea and sea of Cortes fin whales. *Balaenoptera phylasus* (Linnaeus 1758): analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Mol. Ecol.* **7**: 585-599.
- BIRKY Jr. C. W., FUERST P., MARUYAMA T. (1988). Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics* **121**: 613-627.
- BONHOMME F., BOURSOT P., DALLAS J., TABERLET P. (1995). Les marqueurs moléculaires du flux génique et de la structuration spatiale. In *La Révolution Technologique en Ecologie*, J.M. LEGAY et P. BARBAULT. Editions Masson, Paris.
- BOURSOT P., BONHOMME F. (1986). Génétique et évolution du génome mitochondrial des Métazoaires. *Genet. Sel. Evol.*, **18**: 73-98.
- CHIKHI L. (1995). Différentiation génétique chez *Sardinella aurita* et *S. maderensis*, Allozymes et ADN mitochondrial. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. 237 p.
- DALLAS J. (1992). Estimation of microsatellite mutation rate in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome* **2**: 452-456.
- DESMARAIS E., VIGNERON S., BURESI C., ROIZES G. (1995). Détection du polymorphisme dans l'ADN: applications en biologie et médecine diagnostique, épidémiologique, et pronostique. Editions INSERM, Paris.

ESTOUP A., TAILLIEZ C., CORNUET J.M., SOLIGNAC M. (1995). Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species. *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Mol. Biol. Evol.* **13**: 1074-1084.

FELSENSTEIN J. (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package). V. 3.5. University of Washington, Seattle WA.

HANSEN M.M., MENSBERG K.L.D., BERG S. (1999). Postglacial recolonization patterns and genetic relationships among whitefish (*Coreogenus sp.*) populations in Denmark, inferred from mitochondrial DNA and microsatellite markers. *Mol. Ecol.* **8**: 239-252.

HARE M.P., AVISE J.C. (1998). Population structure in the american oyster as inferred by nuclear gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 119-128.

HARTL D.L., CLARK A.G. (1989). Principles of population genetics, second edition. Sinauer Associates, inc. Pub. Massachusetts.

HEDGECOCK D. (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms?. In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. A.R. Beaumont Ed. Chapman & Hall, London, 122-134.

JARNE P., LAGODA P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* **11**: 424-429.

JAZIRI H. (1990). Variations génétiques et structuration biogéographique chez un bivalve marin : l'huître plate *Ostrea edulis* L. Thèse de Doctorat. Université de Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II. 147 p.

JOHANESSON K., RODSTROM E.M., AASE H. (1989). Low genetic variation in Scandinavian populations of *Ostrea edulis* L.- possible causes and implications. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **128**: 177-190.

JULIA S. (1997). Etude de l'isolement par la distance dans les populations marines. Mémoire d'initiation à la recherche. Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes. Université de Montpellier II.

KHOLODOV V. (1994). La mariculture en ex-U.R.S.S. : aspects particuliers du développement de la conchyliculture en Mer Noire. *Aqua-réseau*. Ed/ Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, **2**: 12-15.

KOCHER T.D., THOMAS W.K., MEYER A., EDWARDS S.V., PÄÄBO S., VILLABLANCA F.X., WILSON A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6196-6200.

- LAUNEY S. (1997). Marqueurs microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis* L.: Caractérisation et applications à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l'étude de populations naturelles. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique Paris Grignon. 108 p.
- LEDANTEC X., MARTEIL L. (1976). La reproduction des huîtres. *Rev. Trav. ISPTM*, XL **2**: 233-256.
- LESSA E.P., APPLEBAUM G. (1993). Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol. Ecol.*, 2: 119-129.
- MAGOULAS A., TSIMENIDES N., ZOUROS E. (1996). Mitochondrial DNA phylogeny and reconstruction of the population history of a species: the case of the european anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Mol. Biol. Evol.* 13(1): 178-190.
- MANTEL N. (1967). The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- MATBAASI Z. (1996). Marine Aquaculture in the Black Sea Region : current Status and Development Options. GEF black Sea Environmental Programme. United Nations Publications. New York.
- MORAITOU-APOSTOLOPOULOU M. (1985). The zooplankton communities of the Eastern Mediterranean (Levantine basin, Aegean Sea); influence of man-made factors. Pp 303-331 in *Mediterranean marine ecosystems*, MORAITOU-APOSTOLOPOULOU M. and KIORTSIS V. Eds. Plenum Press, New York, London.
- MORITZ C., DOWLING T.E., BROWN M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 269-92.
- NEI M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HAYASHI K., SEKIYA T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2766-2770.
- PALUMBI S.R., BAKER C.S. (1994). Contrasting Population Structure from Nuclear Intron Sequences and mtDNA of Humpback Whales. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 426-435.
- POR F.D. (1978). Lessepsian migration. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- QUELLER D.C., STRASSMANN J.E., HUGHES C.R. (1993). Microsatellites and kinship. *TREE* **8**: 285-288.
- RANSON G. (1948). Ecologie et répartition géographique des Ostréidés vivants. *Revue de Science* **86**: 469-473.

- REYNOLDS J., WEIR B., COCKERHAM C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient, basis for a short term genetic distance. *Genetics* **105**: 767-779
- RICE W. (1989). Analysis tables of statistical tests. *Evolution* **43**: 223-225.
- ROUSSET F. (1996). Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise Mutation Processes. *Genetics* **142**: 1357-1362.
- ROUSSET F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**: 1219-1228.
- SAAVEDRA C., ZAPATA C., GUERRA A., ALVAREZ G. (1993). Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* **115**: 85-95.
- SAAVEDRA C., ZAPATA C., ALVAREZ G. (1995). Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* **122**: 95-104.
- SAITOU N., NEI M. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- SIMONSEN B.T., SIEGISMUND H.R., ARCTANDER P. (1998). Population structure of African buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci: high variation but low differentiation. *Mol. Ecol.* **7**: 225-237.
- TESSIER N., BERNATCHEZ L., WRIGHT J.M. (1997). Population structure and impact of supportive breeding inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-locked Atlantic salmon *Salmo Salar*. *Mol. Ecol.* **6**: 735-750.
- WARD R.D., WOODWARK M., SKIBINSKI D.O.F. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishes. *J. Fish Biol.* **44**: 213-232.
- WEIR B.S., COCKERHAM C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- WRIGHT S. (1951). The genetical structure of populations *Ann. Eugen.* **15**: 323-354.

Annexe 1 : Protocoles.

PCR :

MILIEU REACTIONNEL :

(pour 30 µl vol. Final).....	×1
Tampon 10×.....	3.00 µl.
MgCl ₂ (50 mM.).....	1.50 µl.
dNTPs (2mM/nucl.).....	3.00 µl.
12S 1bis (20 µM.).....	1.80 µl.
12S 2bis (20 µM.).....	1.80 µl.
TAQ polymérase (6 unités /µl).....	0.12 µl.
H ₂ O ultrapure.....	30.00 µl.(qsp)

PROGRAMME :

temps	température	
3'	95°C (dénaturation)	
1'	95°C (dénaturation)] × 30
1'	54°C (hybridation)	
1'	72°C (élongation)	
7'	72°C (élongation)	

SSCP :

Gels. Pour deux gels :

Acrylamide.....	10.0 ml.
H ₂ O (ultrapure).....	27.5 ml.
TBE 10X.....	2.4 ml.
Persulfate d'Ammonium (10%).....	280.0 µl.
TEMED.....	16.0 µl.

DENATURATION : 6.5 µl. ADN (PCR) + 8 µl. bleu dénaturant*
laisser 7' à 95°C

MIGRATION : 200 V ; ; 150 mA. ; 4°C ; 14 heures.

***Préparation du Bleu dénaturant pour SSCP:**

1- Préparation du colorant 6X:	2- Préparation du bleu dénaturant:		
- 0,25% bleu de bromophénol	Colorant 6X	400µl	1X
- 0,25% xylène cyanol	Formamide	1900µl	95%
- 50mM EDTA	NaOH 1M	20µl	10mM
- 30% Glycérol	EDTA 0.5M	80µl	20mM

Annexe 2 : Composition haplotypique des échantillons

Echantillons	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	M	N	A'	L	Analysés
SEVASTOPOL									12					1		13
DONOUZLAV									18			2	2			22
DUBROVNIK	17	20	7	1					2					1	2	50
VENEZIA	2	15	3		1		1		1							23
PORT ST. LOUIS	18	24	2		1	1		2	1						1	50
THAU	20	25	1						3							49
RIA FORMOSA	7	5							2							14
LA COROGNE	30	3	2													35
LA ROCHELLE	38	4														42
QUIBERON	40	4	1						1							46
PORT BESSIN	25	3	1	1	1	1										32
CORK	17	13								1						31
LOUGH FOYLE	26	13						1		4	3				1	48
GREVELINGEN	18	1	2						1							22
OSLO	17	4	20						6							47
																524

Région	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	M	N	A'	L	Analysés
Mer Noire	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	1	0	0	13
Méditerranée est	17	20	7	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	2	50
Méditerranée ouest	38	49	3	0	1	1	0	2	4	0	0	0	0	0	1	99
Atlantique "sud"	115	16	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	137
Atlantique "nord"	103	34	23	1	1	1	0	1	7	5	3	0	0	0	1	180
TOTAL	273	119	36	2	2	2	0	3	28	5	3	0	1	1	4	479

Résumé

La structuration géographique des populations naturelles d'huître plate (*Ostrea edulis*) a été étudiée à partir de l'analyse du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP), d'un fragment d'environ 300 pb du gène de l'ARNr mitochondrial 12S. Les échantillons (13 localités, 507 individus) utilisés avaient fait l'objet d'une étude antérieure de structuration des populations avec 5 locus microsatellites. Ils ont été analysés ici dans le but d'une comparaison des structurations observées sur marqueurs mitochondrial et nucléaire. La diversité moyenne intrapopulation du gène de l'ARNr 12S ($H_n.b = 0,494$) est presque la moitié de celle estimée avec les microsatellites ($H_n.b = 0,904$) bien que la variance entre populations soit beaucoup plus forte pour l'ADN mitochondrial. Il n'existe pas de corrélation significative entre les diversités estimées des deux marqueurs. Le F_{st} , estimé par le θ de Weir et Cockerham, est significatif dans l'ensemble de l'échantillonnage ($\theta = 0,179$) et à l'intérieur de l'Atlantique ($\theta = 0,153$) mais pas au sein de la Méditerranée. Il est sept fois plus grand que le F_{st} estimé avec l'ensemble des locus microsatellites. Les dendrogrammes des échantillons obtenus avec les deux types de marqueurs sont différents. Par contre, les deux jeux de données montrent des corrélations significatives des distances génétiques (mesurées par $\theta/(1-\theta)$) et géographiques. Nous discutons des causes possibles des différences observées (faible effectif efficace et haploïdie de l'ADN mitochondrial, forts taux de mutation des microsatellites...). De nouveaux échantillons provenant de la Mer Noire montrent une forte différenciation avec les stocks de Méditerranée et d'Atlantique, ainsi que de très faibles diversités haplotypiques. Ces résultats suggèrent un faible flux génique entre ces mers et l'existence d'un goulot d'étranglement récent.

Abstract

The geographic structure of natural populations of the flat oyster (*Ostrea edulis*) was assessed by single strand conformation polymorphism (SSCP) of a 300 bp fragment of the mitochondrial 12S rRNA gene. The samples (13 localities, 507 individuals) were from an earlier study of population structure using microsatellites. The aim of the present study was to compare levels and patterns of structure revealed by mtDNA and microsatellites. The average intrapopulation genetic diversity of the 12S rRNA gene ($H_n.b. = 0,494 \pm 0,164$) was twice smaller than the average for microsatellites ($0,907 \pm 0,04$), but the geographic variation in mitochondrial diversity was much greater. There was no correlation between haplotype diversity and microsatellite diversity in a population. Weir and Cockerham's θ estimator of F_{st} was significantly different from 0 on the entire area sampled ($\theta = 0,179$) and on the Atlantic coasts ($\theta = 0,153$), but not in the Mediterranean sea. It was seven fold greater than values obtained with microsatellites. The Neighbor-joining dendrograms also showed slight differences, but genetic ($\theta/(1-\theta)$) and geographic distances (coastal distances) were significantly correlated for both markers. We discuss the possible reasons for the differences observed between mtDNA and microsatellites data (lower effective population size and haploidy of mitochondrial DNA, high mutation rates of microsatellites...). Two additional samples from the Black Sea showed large differences with all the other populations, and haplotype diversity was very low. These results suggest that gene flow with the other seas is very small, and that a recent bottlenecks has occurred.